

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 62-166897

(43)Date of publication of application : 23.07.1987

(51)Int.Cl.

C12P 21/00  
A61K 39/395  
C07K 15/04  
C12N 5/00  
C12N 15/00  
G01N 33/53  
G01N 33/577  
// (C12P 21/00  
C12R 1:91 )

(21)Application number : 61-007833

(71)Applicant : TOYO SODA MFG CO LTD  
UCHIDA TAKESHI

(22)Date of filing : 20.01.1986

(72)Inventor : TSUNEOKA MAKOTO  
UCHIDA TAKESHI

(54) MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST INTRANUCLEAR NONHISTONE PROTEIN

(57)Abstract:

PURPOSE: A monoclonal antibody, obtained by transmigrating together with an intranuclear nonhistone protein high mobility group (HMG-1) from a cytoplasm to a nucleus and useful as a diagnostic agent for living bodies.

CONSTITUTION: An intranuclear nonhistone protein high mobility group-1 (HMG-1) derived from a human tissue, etc., is administered to a mouse, etc., and immunized to give cells capable of producing an antibody, e.g. lymphocyte, etc. The resultant cells in an amount of 5W20 times based on myelomatous cells, e.g. SP2/o-Ag14, etc., are then added to the myelomatous cells and subjected to cell fusion in the presence of polyethylene glycol. The resultant hybridoma is further cloned in an agar culture medium, etc., to afford a monoclonal antibody, which is then multiplied in a mammalian abdominal cavity or culture medium to produce an anti HMG-1 antibody. The resultant antibody is then separated and recovered to provide the aimed monoclonal antibody against the intranuclear nonhistone protein.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the  
examiner's decision of rejection or application]

B6

converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭62-166897

⑬ Int. Cl.

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和62年(1987)7月23日

C 12 P 21/00  
A 61 K 39/395  
C 07 K 15/04  
C 12 N 5/00  
15/00  
G 01 N 33/53  
33/577  
/(C 12 P 21/00  
C 12 R 1:91)

6712-4B  
7252-4C  
8318-4H  
7115-4B  
7115-4B  
D-7906-2G  
7906-2G

審査請求 未請求 発明の数 3 (全5頁)

⑮ 発明の名称 核内非ヒストン蛋白質に対するモノクローナル抗体

⑯ 特 願 昭61-7833

⑰ 出 願 昭61(1986)1月20日

⑱ 発 明 者 常 岡 誠 東京都世田谷区赤堤1丁目23番17号

⑲ 発 明 者 内 田 駿 豊中市上新田1丁目24番地 B-701号

⑳ 出 願 人 東洋曹達工業株式会社 新南陽市大字富田4560番地

㉑ 出 願 人 内 田 駿 豊中市上新田1丁目24番地 B-701号

明 細 書

1 発明の名称

核内非ヒストン蛋白質に対するモノクローナル抗体

2 特許請求の範囲

(1) 核内非ヒストン蛋白質ハイモビリティーグループ1と共に細胞質から核に移行するモノクローナル抗体。

(2) 核内非ヒストン蛋白質ハイモビリティーグループ1と共に細胞質から核に移行することのできるモノクローナル抗体の産生能を持つクローン化されたハイブリドーマ細胞。

(3) 核内非ヒストン蛋白質ハイモビリティーグループ1で免疫した哺乳動物の抗体産生細胞と骨髓腫細胞との間にハイブリドーマを形成させ、該ハイブリドーマをクローン化して核内非ヒストン蛋白質ハイモビリティーグループ1に対する抗体を選択し、該クローンを哺乳動物腹腔内又は培地中で増殖させ該哺乳動物腹水中又は培地中に抗核内非ヒストン蛋白質ハイモビリティーグループ

1抗体を産生させ、これを分離回収することを特徴とする核内非ヒストン蛋白質ハイモビリティーグループ1に対するモノクローナル抗体の製造法。

3 発明の詳細な説明

[産業上の利用分野]

本発明は核内非ヒストン蛋白質ハイモビリティーグループ1に対するモノクローナル抗体に関するものであり、更に詳しくは核内非ヒストン蛋白質ハイモビリティーグループ1(以下HMG-1と略称する)に特異的なモノクローナル抗体、このモノクローナル抗体を産生することのできるクローン化されたハイブリドーマ細胞及びこのモノクローナル抗体の製造方法に関するものである。

HMG-1は均一に精製され、アミノ酸配列も知られている数少ない非ヒストン蛋白質の一つである。HMG-1は様々なタイプの動物の様々なタイプの細胞でその存在が認められている。またDNAやヒストンH-1等と結合する性質を持ち、ヌクレオソームのリンカーレージョンに局在する。

HMG-1の生物学的な機能として細胞の核内でのRNAの転写、或いはDNAの複製等に関与しているといわれている。また、HMG-1は細胞の細胞質内に導入された時、直に核に移行する性質が知られている。

ほとんどすべての遺伝情報は核中に保存されており、物質を用いて直接それに影響を与えるためには、まずその物質が核中に移行することが重要である。細胞質から核に、HMG-1と共に移行していくモノクローナル抗体は、RNAへの転写、DNAの複製等の核内の機能を調べることに有用である。また、HMG-1量を直接測定することに関しても有用である。また、HMG-1を精製する際にも有用な手段を提供する。

#### 【従来の技術】

脾臓細胞と骨髓腫細胞とのハイブリドーマは文献中に記載されている。例えば Kochler et al., *Nature* 258, 435(1975) 及び Eur. J. Immunol. 5 11 (1976)、Milstein et al., *Nature*, 286, 550(1977) 等があげられる。それ以来、ヒトイン

ドーマクロンを培養及びクローン化してHMG-1に特異性を示す抗体を産生するクローンとして選択されるものである。

HMG-1としては、ヒト、ウシ等の高等動物の組織又は細胞由来のものを用いることができる。

HMG-1を抗原として使用するため、HMG-1を精製する。HMG-1の精製に関しては文献に記載されている。ここでは「Sanders, C., *Biochim. Biophys. Acta*, 73, 1034 - 1042 (1977)」の方法を用いることができる。精製されたHMG-1はその抗原性を高めるため

「Carroy, J. S. et al., *Methods in Immunology: A Laboratory Text for Instruction & Research*, 3rd Ed., 153 - 158, Addison - Wesley Publishing Co., Reading MA」の方法を用いて化学的に修飾することができる。修飾されたHMG-1は、生理食塩水、或いは緩衝液などに溶解し、例えばマウス又はラットの場合一匹あたり一回に10~100 $\mu$ gを投与するのが好ましい。免疫操作は数回にわたって行なうが、最後の

スリン (特開昭60-51253)、インターロイキン 2 (特開昭60-51121) 等を抗原とした単クローン性抗体が多数報告されている。

ところで、HMG-1と共存する場合に細胞質から核に移行する性質を持つ抗HMG-1モノクローナル抗体は従来報告されていない。

#### 【問題を解決するための手段】

本発明はHMG-1に対して特異性を示すモノクローナル抗体及びこのモノクローナル抗体を産生することのできるハイブリドーマクローン及び該クローンが産生する抗HMG-1モノクローナル抗体を提供するものである。

本発明のモノクローナル抗体はIgA等のイムノグロブリンからなる。

本発明のハイブリドーマクローンは骨髓腫細胞とトリニトロフェノール (以下TNPと略称する) などの修飾剤により化学的に修飾されたHMG-1で免疫された哺乳動物、特にマウス、ラット等の脾臓又はリンパ節の細胞中に存在する抗体産生細胞とのハイブリドーマを作成し、このハイブリ

ドーマを免疫操作をのぞいてアジュバントと共に行なわれる。免疫は1~2週間の間隔で行ない、最終免疫はアジュバントを使用せず、生理食塩水などに溶解し腹腔内或いは静脈内に投与する。免疫動物としては一般にはラット及びマウスが採用される。これは細胞融合に使用する腫瘍細胞株によって決められる為で、マウスの中でも免疫グロブリンを産生しないBALB/cがよく用いられる。最終免疫2~4日後にリンパ節或いは脾臓を摘出し、得られたリンパ球を細胞融合に供する。

一方細胞融合に使用される腫瘍細胞株としては、免疫グロブリンを産生しないP3-X63-Ag8-U1やSP2/o-Ag14などが使用される。細胞融合時にはリンパ球を腫瘍細胞の5~20倍量多く用いるのが適当である。DMEM培地、RPMI1640培地或いは、生理食塩水で洗浄後、リンパ球と腫瘍細胞を遠心操作でペレット状態にする。ペレットをほぐした後、ポリエチレングリコール (以下PEGと略称する) を加え、細胞融合を行なうが、通常はPEGの平均分子量

1, 000~8, 000の40-60%溶液を0.5~2ml使用する。融合促進剤としてPEG添加時にジメチルスルホキシドなどを少量加えることも有効である。PEG溶液を細胞に添加し、融合反応を1~10分間程度行なった後、

DMEM培地或いはRPMI 1640培地などを10~50ml徐々に加え反応を停止する。融合反応停止後直ちに遠心し、上清を除去する。牛胎児血清(以下FCSと略称する)を5~20%含むDMEM培地或いはRPMI 1640培地に細胞を懸濁し、96穴培養プレートにリンパ球が1穴あたり $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$ 個となるよう分注する。次にヒポキサンチン( $1 \times 10^{-4}M$ )、チミジン( $1.6 \times 10^{-5}M$ )、アミノプテリン( $4 \times 10^{-7}M$ )を含むDMEM培地(或いはRPMI 1640培地)、即ちHAT培地に換えていく。HAT培地交換の方法は一般には、翌日培養プレートにはじめに分注した容量と当容量を加え、その後、2~3日毎にHAT培地で半量ずつ交換する。融合後10~14日目にアミノプテリ

ンを除いたHT培地で2~3日毎に培養液交換を続ける。融合細胞(ハイブリドーマ)の増殖のさかんな穴の培養上清を種々の分析法、例えばRIA、ELISA等で目的の抗体産生ハイブリドーマを選択する。得られた抗HMG-1抗体価をもつ抗体を産生するハイブリドーマを次にクローニングする。クローニングには寒天培地中でコロニーをひろう方法、限界希釈法などがある。どの方法を用いてもクローニングは2回以上くり返し、完全に単一クローンとする。確立したクローンは、その細胞をin vitro又はin vivoで培養することによって単クローン性抗HMG-1抗体が得られる。目的とするモノクローナル抗体はこのようなクローンを培養した培養上清から塩析、イオン交換クロマトグラフィー等の精製操作により回収できる。また抗HMG-1産生ハイブリドーマを組織適合性動物の腹腔内に移植し、増殖させ、該動物の腹水中に産生されたモノクローナル抗体を精製回収することもできる。

本方法によりヒト型のHMG-1と結合しうる

モノクローナル抗体を作成することができる。

また本方法により分子量は約90万のIgM、16万前後の他のタイプのイムノグロブリンを作成することができる。

#### 【作用】

本発明のモノクローナル抗体は抗原-抗体反応によりHMG-1と結合させて複合体を形成させることができる。この複合体は細胞中に注入されたとき、核膜を通過して核内に移行する。

細胞質中に物質を注入する方法は、マイクロピペットを用いて直接細胞内に注入する方法(Gracssmann, H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. US, 73, 366 (1976)、赤血球ゴーストを利用する方法(Mirosava, H. et al., Nature 249, 449 (1974))等が知られている。この時、物質をあらかじめ、ラジオアイソトープあるいは蛍光色素等で標識しておく、その物質の細胞内での局在を知ることができる。標識された物質を細胞質中に注入後、一定時間後、細胞を細胞質画分と核画分とに分け、その画分中の標識物質の量を定量する

ことにより、物質の細胞内での局在を知ることができる。細胞の分画の方法は文献「Yamaizumi, H. et al., Nature 273, 782-784(1978)」にある。ここで開発した抗HMG-1モノクローナル抗体だけ単独で細胞質に注入される場合は、細胞質から核への標識物の移行は観察されないが、該モノクローナル抗体をあらかじめ抗原であるHMG-1と共に混合し、充分反応させてから細胞質中に注入すると標識物は核中に移行する現象が観察される。

以下に実施例により本発明を詳細に説明する。

#### 実施例1

文献「Carvey, J. S. et al., Methods in Immunology: A Laboratory Text for Instruction & Research, 3rd Ed., 153-158 Addison-Wesley Publishing Co., Reading MA」に従い、ウシ型HMG-1(ウシ胸腺由来)、1分子に対し、6分子のTNP分子を化学的に結合させたTNP修飾HMG-1蛋白質50μgを完全フロ

イントアジュバントと混ぜ、8週令のBALB/cマウスに腹腔内注射した。10日後に不完全フロイントアジュバントと混ぜた核蛋白質50 $\mu$ gを10日毎に6回注射した。最後の感作後10日後に50 $\mu$ gのHMG-1蛋白質によりブーストした。4日後該マウスから脾臓細胞をとり出し、45%(V/V) PEG 4,000, 15%(V/V) ジメチルスルホキシを用いてSP2/o細胞と細胞融合した。細胞融合後、細胞を96穴培養プレートに分注し、HAT培地中で培養した。該細胞を14日間HAT培地中で増殖させ、ついで徐々にHT培地にうつした。抗体産生ハイブリドーマの選択はRIAによりなされた。すなわち0.2 $\mu$ g/mlのHMG-1でコートされた後2%子ウシ血清でコートされたポリビニルクロライドマイクロタイタープレートを生理食塩水で洗浄した後、ハイブリドーマ培養上清100 $\mu$ lをマイクロタイタープレートの穴の中に入れ40℃、一夜放置した。該プレートを生理食塩水で洗浄後<sup>125</sup>Iで標識した抗マウスIgGウサギIgGFabフラグ

分離した。すなわち、2.0mMから0.3Mのリン酸緩衝液の直線濃度勾配をかけ、蛋白質を分離した。15 $\mu$ gの抗HMG-1モノクローナル抗体が0.2Mリン酸緩衝液付近で溶出してきた。

二次元拡散法により精製したFR-1産生抗体はIgAタイプであることが確認された。また1.5 $\times$ 8.0cmのセファデックスG-200によるカラムクロマトグラフィーにより分子量を推定したが、FR-1産生モノクローナル抗体は分子量約15万のIgGと同一画分に回収され、その分子量は約17万と推定された。

精製したこのモノクローナル抗体は抗原として用いたウシ型HMG-1だけでなく、ヒト型のHMG-1とも結合した。すなわちヒト培養細胞、FL細胞から精製したHMG-1を<sup>125</sup>Iで標識し、精製したこのモノクローナル抗体をセファロースに結合し、免疫沈殿法を行ったところラジオアクティビティーはセファロースとの沈殿に移行した。

実施例2

メントを加え、室温で4時間放置した。該プレートを再び生理食塩水で洗浄後完全に乾かし、サーカウンターにより、ラジオアクティビティーを測定した。ラジオアクティビティーの陽性のハイブリドーマすなわち抗HMG-1抗体を産生しているハイブリドーマを限界希釈法により2回クローニングし、本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得た。

本操作により3株の陽性ハイブリドーマ、FR-1、FR-2及びFR-3を得た。

こうして得たハイブリドーマ、FR-1株を5匹のBALB/cマウス腹腔内に注射し、10日後にモノクローナル抗体を含む腹水10mlを得た。得られた腹水10mlを遠心し上清を集め、0.7倍容の100%飽和硫酸を加えた後、10分間4℃、2000 $\times$ gで遠心した。沈殿を40%飽和硫酸で3回洗浄し、10mMEDTA溶液に溶解し、20mリン酸緩衝液(pH8.0)に対して透析した。透析後、20mリン酸緩衝液(pH8.0)で平衡化されたDEAEセルロースカラムにより

<sup>125</sup>Iで標識された抗HMG-1モノクローナル抗体をHMG-1と共に又はHMG-1なしで4℃一夜放置した後、赤血球ゴースト法により、FL細胞に注入した。すなわち、1.4 $\mu$ g/mlの<sup>125</sup>Iで標識された抗HMG-1モノクローナル抗体と2.2 $\mu$ g/mlのHMG-1とを含む赤血球ゴーストあるいは、1.4 $\mu$ g/mlの該モノクローナル抗体と2.2 $\mu$ g/mlの卵アルブミンを含む赤血球ゴーストをセンダイウィルスを用いて、同数のFL細胞と融合した。融合後、細胞混合液は、10%の子ウシ血清を含むMEM培地(以下10CS-MEMと略称する)で3回洗った後、さらに融合していない赤血液ゴーストを完全に除くため155mNH<sub>3</sub>Cl、10mKHCO<sub>3</sub>、1mNa<sub>2</sub>-EDTA(pH7.0)溶液中に懸濁し、0℃で7時間放置した。さらに一度FL細胞を10CS-MEMで洗った後、10CS-MEM中で培養した。

融合、30分、1時間、6時間後に細胞をトリプシンとEDTAを用いて浮遊させ回収した。該

細胞を20 mM KCl、5 mM MgCl<sub>2</sub>、50 mM Tris (pH 7.6) 溶液を用いて一回洗った後、0.5% Triton X-100、10 mM NaCl、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mM Tris (pH 7.4) 溶液中でホモジナイズし、遠心し、上清と沈殿に分けた。上清を細胞質画分、沈殿を核画分として用いた。<sup>125</sup>I 標識モノクローナル抗体をHMG-1と共にFL細胞に注入した時には30分後に注入したラジオアクティビティの15%が核画分中に存在し、1時間後には約25%にまで増え、そのまま5時間後までその状態は続いた。一方<sup>125</sup>I 標識モノクローナル抗体だけで細胞に導入した場合は、導入したラジオアクティビティの2~3%のみが核画分にあるだけであった。本実施例により本発明のモノクローナル抗体が単独ではなくHMG-1とともに核内に移行することが証明された。

#### 【発明の効果】

本発明のモノクローナル抗体は核内非ヒストン蛋白質と複合体を形成し核膜を通過して核内に移

行することができるので、核内非ヒストン蛋白質の細胞内、特に核膜近傍でのこの蛋白質の挙動を調べるために有用であり、細胞レベルでの生体の診断用の試薬として有用であると考えられる。

特許出願人東洋曹達工業株式会社

同 内 田 曉